

Cientific Paper

Resumo

Objetivou-se neste trabalho avaliar diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM) na indução de resistência ao tombamento de plântulas de tomateiro e no controle de *Rhizoctonia solani* Kuhn *in vitro*. O tratamento das sementes de tomateiro foi realizado, com imersão em solução de ASM por 5 min nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g. i.a./100L e a testemunha (água destilada). Em seguida foram

semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo o substrato Plantmax Florestal® previamente esterilizado e inoculado com *R.solani*, sendo a unidade experimental constituída por 20 células, em 4 repetições. O experimento foi conduzido por 14 dias em câmara de cultivo com controle de temperatura (23oC ±2), luminosidade (fotoperíodo de 12horas) e umidade (70% ±10) e então avaliada a germinação das sementes, incidência de tombamento, comprimento de plântula e massa da matéria fresca. Foi também quantificado nos tecidos das plântulas os teores das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), β-1,3-glucanase e quitinases. No experimento *in vitro*, a unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri, em 4 repetições, sendo o ASM incorporado ao meio BDA (Batata-dextrose e Agar) e avaliado o crescimento micelial de *R.solani*. A aplicação de ASM nas sementes de tomateiro não interfere na incidência de tombamento de plântulas, mas induz a resistência ativando as enzimas β-1,3-glucanase e quitinase. O ASM não apresentou efeito fungitoxico sobre *R.solani*, *in vitro*.

Palavras chave: *Solanum lycopersicum* Mill, fitotóxico, indutor resistência, proteína-RP.

Acibenzolar-S-methyl for induction of resistance in tomato and *Rhizoctonia solani* kuhn control *in vitro*

Abstract

The aim of this study was to evaluate different concentrations of acibenzolar-S-methyl (ASM) in the induction of resistance to damping-off in tomato seedlings and controlling *Rhizoctonia solani* Kuhn *in vitro*. The treatment of tomato seeds was carried out with immersion in ASM for 5 min at concentrations of 2.5; 5.0; 10.0 and 20.0 g ai / 100L and the control (distilled water). Then were sown in polystyrene trays containing Plantmax Florestal® sterilized and inoculated with *R.solani*, and the experimental unit consisting of 20 cells in 4 repetitions. The experiment was conducted for 14 days in a culture chamber with controlled temperature (23oC ± 2), light (photoperiod of 12 hours) and humidity (70% ± 10) and then tested for germination of

Received at: 26/11/14

Accepted for publication at: 11/06/15

1 Eng. Agrônomo, MSc. Mestrando do Programa de pós graduação em Agronomia (PPGAG) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR - campus Pato Branco. Email: dj_bertoncelli@hotmail.com

2 Eng. Agrônomo, Dr. prof. Programa de pós graduação em Agronomia (PPGAG) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR - campus Pato Branco. Email: sergio@utfpr.edu.br.

3 Doutoranda Programa de pós graduação em Agronomia (PPGAG) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR - campus Pato Branco. Email: ritadserrao@hotmail.com.

4 Eng. Agrônomo, Dr. prof. Programa de pós graduação em Agronomia (PPGAG) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR - campus Pato Branco. Email: jpossenti@utfpr.edu.br.

5 Eng. Agrônomo, Dr. prof. Programa de pós graduação em Agronomia (PPGAG) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR - campus Pato Branco. Email: americowagner@utfpr.edu.br.

seeds, the incidence of tumbling, seedling length and fresh weight. Was also quantified in the tissues of the seedlings the levels of the enzymes phenylalanine ammonia lyase (PAL), β -1,3-glucanase and chitinase. In vitro, the experimental unit consisted of a Petri dish in 4 replicates, and the ASM embedded in PDA (potato dextrose agar) and rated the mycelial growth of *R.solani*. The implementation of tomato seeds in ASM does not interfere in the incidence of damping off of seedlings, but induces resistance by activating β -1,3-glucanase and chitinase enzymes. The ASM showed no antifungal effect on *R. solani* in vitro.

Key words: *Solanum lycopersicum* Mill, phytotoxic, inductor resistance, protein-RP.

Acibenzolar-S-metilo en la inducción de resistencia en tomates y control de *Rhizoctonia solani* kuhn in vitro

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar las diferentes concentraciones de acibenzolar-S-metil (ASM) para inducir la resistencia al doblamiento (inflexión) de plántulas de tomate en control de *Rhizoctoniasolani* kuhn in vitro. Un tratamiento de semillas de tomate fue realizado con inmersión en solución de ASM por 5 minutos en concentraciones de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g. i.a./100 L en un testigo (água destilada). En seguida fueron sembradas en bandejas expandidas de polietileno conteniendo sustrato Plantmax Florestal® previamente esterilizado e inoculado com *R. solani*, siendo La unidad experimental constituída por 20 células, en cuatro repeticiones. El experimento se llevó a cabo por 14 días en cámara de cultivo con control de temperatura ($23\text{oC} \pm 2$), iluminación (fotoperíodo de 12 horas) y humedad ($70\% \pm 10$) y entonces se evaluó la germinación de las semillas, incidencia de doblamiento, longitud de la plántula y peso fresco. Tambien se cuantificó en los niveles de los tejidos de las plántulas las enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), β -1,3-glucanase y quitinasas. En el experimento in vitro la unidad experimental estuvo contenida en una caja petri en cuatro repeticiones incorporando al medio BDA (Batata-dextrose e Agar) y midiendo el crecimiento del micélio *R. solani*. La aplicación de ASM en las semillas de tomate no interfiere en la incidencia de doblamiento de plántulas, mas induce a la resistencia activando las enzimas β -1,3-glucanase y quitinasa. El ASM no representó efecto fungitóxico sobre *R.solani*, in vitro.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* Mill, fitotóxico, indutor a la resistencia, proteína-RP.

Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicon*) está entre as hortaliças mais consumidas no mundo o qual pertence à família das solanáceas e é rico em licopeno, um poderoso antioxidante, além de ser uma importante fonte de vitaminas e minerais (FERREIRA et al., 2006)

Anualmente varias toneladas de tomate são deixadas de produzir devido a danos causados por doenças, sendo que nos estádios iniciais da cultura a doença que mais causa perdas na produção é o tombamento de plântulas ou damping-off, sendo na maioria dos casos causado por causado *Rhizoctoniasolani*, o qual é considerado parasita primitivo e não especializado, capaz de causar podridões de sementes e tombamentos de pré e pós-emergência em várias culturas em condições ambientais muito amplas (MICHEREFF et al., 2005).

O controle de doenças a partir da ativação das defesas naturais das plantas tem sido cada vez mais estudado, tendo como vantagens, o caráter sistêmico, pois além de ser persistente e natural da proteção, tem efetividade contra fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos (PASCHOLATI; TOFFANO, 2007).

As plantas podem ter seu sistema de defesa induzido pela ativação dos mecanismos latentes por meio de agentes externos bióticos ou abióticos, sendo este fenômeno conhecido como resistência sistêmica adquirida (RSA) (BEDENDO et al., 2011). Estes agentes de indução de resistências são popularmente chamados de eliciadores.

Diversos eliciadores podem induzir sinais de ativação das defesas vegetais, minimizando a presença de patógenos, sendo que dentre os indutores abióticos, os mais comuns utilizados na agricultura são o ácido salicílico (AS), o acibenzolar-S-metil

(ASM), o ácido jasmônico (AJ), dentre outros. A partir da descoberta do ASM, foi dado um grande passo no campo da indução de resistência, já que o composto deu o impulso necessário para que empresas se interessassem na fabricação de produtos a partir de compostos passíveis de serem patenteados (SOBRINHO et al., 2005).

KATARIA et al. (1997), observaram que o ASM na concentração de 2 mM reduziu em 50% o crescimento micelial de *Rhizoctoniasolani*. Em tomateiro a aplicação de ASM em conjunto com fungicidas (ASM + mancozeb alternado com difenoconazole e azoxystrobin) reduziu a severidade da doença pintapreta causada por *Alternaria solani*(TOFOLI e DOMINGUES, 2005). O ASM pulverizado sobre plantas de tomateiro inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria*, resultou em um aumento de enzimas ligadas à resistência induzida, relacionadas à lignificação como estratégia de defesa da planta (CAVALCANT et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações de ASM na indução de resistência ao tombamento de plântulas de tomateiro e no controle de *Rhizoctonia solani*, in vitro.

Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos, sendo a etapa de cultivo conduzida em uma câmara controlada (sistema fitotron), instalada no Laboratório de Fisiologia vegetal eoin vitro no laboratório de fitopatologia na mesma Instituição, no ano de 2014.

O tratamento das sementes foi realizado, com imersão das mesmas em solução de ASM por 5 min nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g. i.a./100L, e a testemunha (água destilada), em delineamento inteiramente casualizado em quatro repetições. Em seguida foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo o substrato Plantamax Florestal® previamente esterilizado e inoculado com *R.solani*. Cada repetição foi constituída por 20 células, aonde cada célula recebeu uma semente tratada com o indutor.

O micélio de *R.solani*, foi previamente inoculado em sementes de trigo autoclavadas, sendo mantidos em incubadora B.O.D. Essas sementes de trigo contaminadas com *R. solani*, foram utilizadas como veículo contaminante ao substrato esterilizado, na proporção de 10g kg⁻¹. Os inóculos foram incorporados ao substrato três dias antes de receber as sementes.

A bandejas foram mantidas na câmara de cultivo com as dimensões de 2,5 comprimento x 2,5m largura x 2,50m altura, com controle temperatura (23oC ±2), luminosidade (fotoperíodo de 12horas) e umidade (70% ±10). Após 14 dias finalizou-se o experimento, analisando as variáveis, germinação das sementes, incidência de tombamento, comprimento de plântula e massa da matéria fresca. Nos tratamentos testemunha e na maior concentração de ASM (20,0 g i.a. 100L) foram também quantificados, nos tecidos das plântulas, os teores das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), β-1,3-glucanase e quitinases, sendo que as amostras foram constituídas por 0,5 g, mescladas entre todas as partes do vegetal (folhas, talo e raízes), as quais foram imediatamente após a coleta, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até as avaliações.

A porcentagem de emergência foi avaliada considerando o número de plântulas germinadas, e determinado a porcentagem considerado o percentual total de 20 sementes por repetição. O percentual de tombamento foi considerado o número de plântulas que apresentaram sintomas da doença. O tamanho de plântulas foi determinado com auxílio de um paquímetro. A produção de massa de matéria fresca total (parte aérea e raízes) das plântulas foi avaliada considerando o peso de massa fresca, sendo antes das pesagens as raízes lavadas e a massa determinada em balança de precisão.

A determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por KUHN (2007), aonde se utilizou 0,25 g da amostra com mais 3,0 mL do tampão TRIS - HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe e centrifugado por 10 minutos, a 4°C a 6000 rpm. Após, foi transferido uma alíquota de 200 µL para tubo de ensaio, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada em vórtex, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, esta solução foi agitada em vórtex para homogeneização. E após, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40°C. Depois de retirados do banho-maria, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação e assim poder ser feita a leitura em espectrofotômetro a 290 nm.

Para dosagem das atividades de quitinase e β-1,3-glucanase as amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com

posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de "CM-chitin-RBV", a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg.ml⁻¹, LoeweBiochemicaGmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por WIRTH e WOLF (1992) e com o procedimento descrito por GUZZO et al. (1996).

O experimento in vitro foi realizado no Laboratório fitopatologia da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, sendo utilizadas as concentrações de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g. i.a./100L, de ASM, além de uma testemunha contendo água destilada. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições.

O indutor foi incorporado ao meio de cultura B.D.A, com agitador eletromagnético para homogeneizar a mistura. A seguir o meio de cultura foi vertido em placa de Petri®, na câmara de fluxo laminar. Após a solidificação do meio, foram colocados discos com 10 mm de diâmetro, contendo o micélio do *R.solani*, nas placas, com as respectivas concentrações do indutor. Posteriormente, as placas foram mantidas em B.O.D. à temperatura de 25± 1°C e fotoperíodo de 12 horas.

O crescimento micelial foi acompanhado durante dois dias após a incubação em B.O.D, sendo finalizado neste período devido as placas de Petri® de todos os tratamentos, terem suas bordas atingidas pelo crescimento micelial de *R. solani*.

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), e quando significativos, foram submetidos a análise de regressão, sendo adotado um nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Resultados e discussão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o tratamento de sementes de tomateiro com ASM, não resultou em interferência significativa na germinação das sementes, incidência de tombamento de plântulas e no comprimento das mesmas (tabela 1).

Analisando os resultados de germinação das sementes, observou-se que o ASM não apresentou efeito fitotóxico sobre a germinação, sendo este um bom resultado, pois, considerando um efeito inibitório na germinação, este poderia limitar o uso do produto como indutor de resistência no tratamento de sementes de tomateiro, fato este, observado em feijoeiro, aonde o tratamento de sementes com ASM na concentração de 25 g de i.a. por 100 kg de sementes ocasionou efeito fitotóxico, reduzindo a germinação de sementes e promovendo crescimento anormal de plantas (SOARES e MARINGONI, 2002).

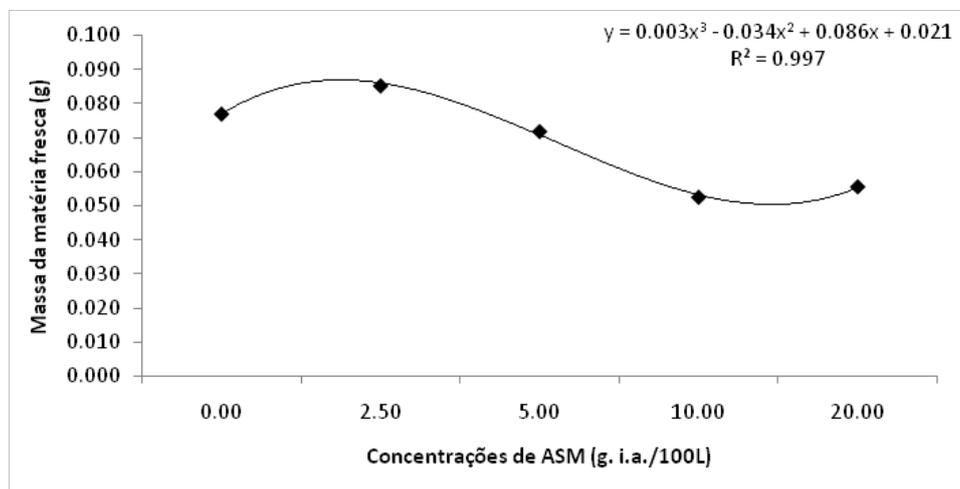
Do mesmo modo, a incidência de tombamento, também não apresentou diferença estatística significativa em função do tratamento de sementes com ASM. Porém, apesar de não ter sido possível observar no presente patossistema o efeito do ASM sobre o tombamento de plântulas, esse fato não descarta a ação do mesmo sobre a indução de resistência, pois o ASM é análogo ao ácido salicílico (AS), o qual é atribuído a função de molécula sinalizadora nas plantas, induzindo-as a expressar

Tabela 1. Germinação de sementes, incidência de tombamento e comprimento de plântulas de tomateiro submetidas ao tratamento de sementes com ASM, e à inoculação de *R.solani*. Dois Vizinhos, 2014

Concentração de ASM (g.i.a./100L)	Germinação (%)	Incidência (%)	Comprimento de plântula (cm)
0	93,75 ^{ns}	6,25 ^{ns}	10,062 ^{ns}
2,50	91,25	8,75	9,970
5,00	95,00	5,00	11,832
10,00	91,25	8,75	9,495
20,00	90,00	10,00	9,425

*ns não significativo a nível de 5% pelo teste F.

Figura 1. Massa da matéria fresca de plântulas de tomateiro, submetido ao tratamento de sementes com ASM e inoculados com *R.solani*. Dois Vizinhos, 2014



resistência contra o ataque de patógenos. Aplicações exógenas de AS induz a expressão gênica de proteínas envolvidas na indução da resistência sistêmica adquirida levando-se a proposição do papel do AS endógeno na resistência a doenças (CHET, 1993), pela expressão de proteínas relacionadas a patogenicidade (PRPs) (CAMPOS, 2009).

Do mesmo modo que para germinação e incidência, o tratamento de sementes de tomateiro com AS não interferiu no comprimento das plântulas, sendo isso positivo, demonstrando não haver dano fitotóxico sobre os tecidos meristemáticos, ao quais são responsáveis pela inserção de novas células nos ápices caulinares e radiculares (TAIZ e ZEIGER, 2013). Resultado semelhante foi observado em soja, aonde a aplicação de ASM não alterou os valores de CP (DEBONA et al., 2009).

Por sua vez a massa da matéria fresca apresentou redução com a aplicação de ASM na semente, em concentrações superiores a 2,50 g. i.a./100L (figura 1).

Resultado semelhante foi observado em feijoeiro, aonde o tratamento com ASM induziu a resistência a *Xanthomonas axonopodispv. phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum*, porém houve redução da massa seca e do crescimento, com diminuição da produtividade do feijoeiro tratado com ASM, principalmente para os tratamentos que receberam mais aplicações (KUHN, 2007).

Segundo KUHN (2007), há uma diminuição

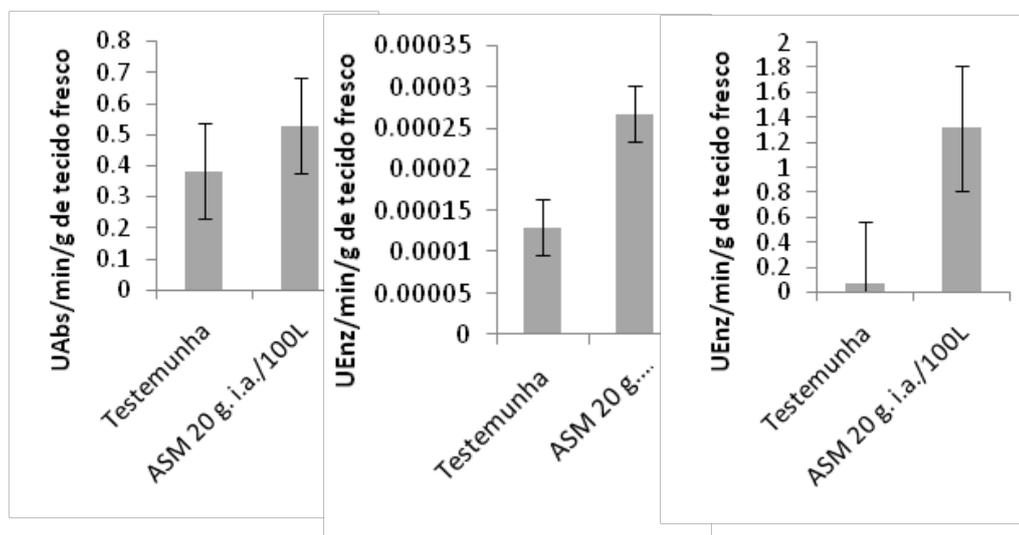
da produtividade e rendimento das plantas tratadas com ASM em função do custo energético alocado pela planta para a ativação de seus mecanismos de defesa. Ainda HEIL et al. (2000), afirmam que a produção de proteínas-RP podem competir com proteínas necessárias aos processos básicos da planta, podendo comprometer o crescimento e desenvolvimento dela.

Em relação a atividade enzimática, pode-se observar na figura 2, que a atividade da fenilalanina-amonialase (FAL) não foi alterada significativamente pela aplicação de ASM na semente, por outro lado, as enzimas quitinase e β -1,3-glucanase tiveram aumento na sua atividade com a aplicação do eliciador.

A aplicação de ASM em plantas de feijoeiro aumentou significativamente a atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase (KHUN e PASCHOLATI, 2010). Esta ativação das enzimas está relacionado ao fato de que o ASM é um análogo ao AS, o qual gera um sinal sistêmico de transdução de genes que codificam proteínas RPs e enzimas relacionadas à produção de fitoalexinas e lignina (DANNER et al., 2008; GOELLNER e CONRATH, 2008), ou seja, ativando o complexo de defesa vegetal.

RESENDE et al. (2002), afirmam que a ativação dos mecanismos de defesa promovidas pelo ASM envolve o aumento na atividade de determinadas proteínas (proteínas PR), como β -1,3-glucanases e quitinases, além de peroxidases e polifenol oxidases, podendo variar de acordo com a planta utilizada.

Figura 2. A - Atividade da enzima fenilalanina-amonialiase (FAL), B - Atividade da enzima quitinase, C - Atividade da enzima, a partir de plântulas de tomateiro submetidas ao tratamento de sementes com ASM, e inoculadas com *R.solani*.



Em seu trabalho SILVA et al. (2007), observaram que a aplicação de 0,05 g/L de ASM em plantas de tomateiro reduziu a incidência de murcha, causado por *Ralstonia solanacearum*, devido a maior atividade das enzimas quitinase e peroxidase. Em Caupi, a aplicação de ASM diminuiu a incidência de *Fusarium oxysporum* pela ativação de defesa vegetal, através da maior atividade de β -1,3-glucanase, peroxidase e FAL (RODRIGUES et al., 2006)

Em relação ao efeito *in vitro* do ASM, não se observou efeito direto do mesmo, sobre o crescimento micelial de *R.solani*, já que na primeira avaliação (segundo dia após a incubação), em todos os tratamentos o micélio do fungo havia ocupado toda a placa. A aplicação de 0,05 g/L de ASM não influenciou o crescimento micelial de *Ralstonia solanacearum* (SILVA et al., 2007).

Resultado contrário foi observado utilizando ASM na concentração de 2 mM, a qual reduziu em 50% o crescimento micelial de *R. solani* (KATARIA et al., 1997).

Analisando os dados de maneira conjunta é possível observar que apesar de o ASM ter ativado

o complexo de defesa vegetal, não foi observado alteração significativa na incidência de tombamento de plântulas de tomateiro, causado por *R.solani*. Segundo MORAES (1992), a RSA torna a planta resistente por várias semanas, a infecções posteriores e a proteção é eficaz contra um grupo de patógenos, e não contra todos, variando de acordo com a espécie vegetal.

Como não houve efeito fitotóxico do indutor sobre a germinação e CP, sugere-se para um próximo estudo, testar concentrações mais elevadas de ASM, no intuito de haver uma maior ativação do mecanismo RSA, além de haver um possível efeito fungicida do elicitor sobre *R.solani*.

Conclusão

A aplicação de ASM nas sementes de tomateiro não interfere na incidência de tombamento de plântulas, mas induz a resistência ativando as enzimas β -1,3-glucanase e quitinase.

O ASM não apresentou efeito fungitoxico sobre *R.solani*, *in vitro*.

Referências

- BEDENDO, I. P. ; MASSOLA Jr., N. S. ; AMORIM, L. Controles Cultural, Físico e Biológico de Doenças de Plantas. In: AMORIM, Lilian; REZENDE, Jorge Alberto Marques; BERGAMIN FILHO, Armando. Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos. Cap. 17. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 367-388, 2011.
- CAMPOS, A. D; HAMPE, M. M. V; FERREIRA, A. G; ANTUNES, I. F; CASTRO, L. A. S. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília v. 44, n. 1, p. 15-21, 2009.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI A. B.; RIBEIRO JUNIOR P. M.; COSTA, J. C. B., SOUZA, R. M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). Fitopatologia Brasileira 31: 372-380, 2006.
- CHET, I. Biotechnology in plant disease control. 373p. New York: Wiley-Liss, 1993.
- DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESE, J.A.; MAZARO, S.M. Indução de resistência à podridãoparda em pêssegos pelo uso de eliciadores em póscolheita. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, p.793799, 2008. DOI: 10.1590/S0100204X2008000700002.
- DEBONA, D; FIGUEIRÓ, G.G; CORTE, G.D; NAVARINI, L; DOMINGUES, L.da.S; BALARDIN, R.S. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e acibenzolar-S-methyl no controle da ferrugem asiática e crescimento de plântulas em cultivares de soja. Summa Phytopathol., Botucatu, v. 35, n. 1, p. 26-31, 2009
- FERREIRA, M.M; FERREIRA, G.B; FONTES, P.C.R; DANTAS, JP. 2006. Qualidade do tomate em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica em duas estações. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.2, p.141-145, 2006.
- GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.121, p.233242, 2008. DOI: 10.1007/s1065800792514.
- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.
- HEIL, M; HILPERT, A; WERNER,K; LINSENMAIR, K.E.Reduced growth and seed following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired (SAR) incur allocation costs? **Journal of Ecology**, Londres, v.88, p.645-654, 2000.
- KATARIA, H.R; WILMSMEIER, B. Efficacy of resistance inducers, free-radical scavengers and an antagonist strain of *Pseudomonas fluorescens* for control of *Rhizoctonia solani* AG-4 in bean and cucumber. **Plant Pathology**, London, v.46, p.897-909, 1997.
- KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento de produção. Piracicaba, 2007, p.138. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- KUHN, O.J; PASCHOLATI, S.F.. Fitness cost of induced resistance in bean plants by the rhizobacteria *Bacillus cereus* or acibenzolar-S-methyl: enzymes activities, phenol and lignin synthesis, and biomass. Summa Phytopathologica, v.36, n.2, p.107-114, 2010.
- MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Cap. 1. Recife: UFRPE, p. 1-18, 2005.
- MORAES, W. C. Controle alternativo de fitopatógenos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992.
- PASCHOLATI, S. F.; TOFFANO, L. Indução de Resistência contra Fitopatógenos em Espécies Arbóreas. In: Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. Cap. 3. Viçosa: UFV, p. 59-66, 2007.

- RESENDE, M.L.V; NOJOSA, G.B.A; CAVALCANTI, L.S; AGUILAR, M.A.G; SILVA, J.O; PEREZ, L.H.C.P; ANDRADE, G.C.G; CARVALHO, G.A; CASTRO, R.M. Induction of resistance in coco against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology Bangor*, v.51, p.621-628, 2002.
- RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E. e COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira* v.31, p.492- 499. 2006.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: *World congress on computers in agriculture, 7*, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SILVA, R.F., PASCHOLATI, S.F. e BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.189-196, 2007.
- SOARES, R.M., MARINGONI, A.C., Efeito de acibenzolar-S-methyl sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, p.41-45, 2002.
- SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.O.; CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.D.S. (Ed.) *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005, v. 13. p. 51-80.
- TAIZ, L; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5 ed. Porto alegre: Artemed, 2013, p.918.
- TÖFOLI, J.G; DOMINGUES, R.J. Controle da pinta preta do tomateiro com o uso de acibenzolar-s-metil isolado, em mistura com fungicidas e em programas de aplicação. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.4, p.481-487, out./dez., 2005
- WIRTH, S.J.; WOLF, G.A.; Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3-β-glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology and Biochemistry*, v.24, p.511-519, 1992.